

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平8-89250

(43)公開日 平成8年(1996)4月9日

(51)Int.Cl.<sup>6</sup>

C 12 N 15/09

C 07 K 14/415

C 12 N 9/04

識別記号

ZNA

府内整理番号

8318-4H

F I

技術表示箇所

G

9281-4B

C 12 N 15/00

ZNA A

審査請求 未請求 請求項の数8 OL (全12頁)

(21)出願番号

特願平6-226159

(22)出願日

平成6年(1994)9月21日

(71)出願人 000003126

三井東庄化学株式会社

東京都千代田区霞が関三丁目2番5号

(72)発明者 本田 秀夫

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄化学  
株式会社内

(72)発明者 島田 浩章

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄化学  
株式会社内

(72)発明者 藤村 達人

千葉県茂原市東郷1144番地 三井東庄化学  
株式会社内

(54)【発明の名称】 アロエのリンゴ酸酵素遺伝子

(57)【要約】

【目的】 アロエのリンゴ酸酵素cDNAを提供すること。

【構成】 アロエのcDNAライブラリーから、リンゴ酸酵素をコードする遺伝子を特定した。

【効果】 このリンゴ酸酵素cDNAを植物細胞に導入することにより、リンゴ酸を脱炭酸する能力を高めることができ。また、生成する二酸化炭素を増大させることによってカルビン回路での炭酸固定能を高めることができる。

1

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 配列番号1の229から1983番までの塩基配列または配列番号2の308から2083番までの塩基配列を含むアロエ・リンゴ酸酵素のcDNA。

【請求項2】 配列番号1の1から585番のアミノ酸配列もしくは配列番号2の1から592番のアミノ酸配列またはこれらアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列で表される、アロエ・リンゴ酸酵素活性を有するアロエ・リンゴ酸酵素。

【請求項3】 請求項2のアロエ・リンゴ酸酵素をコードし、イントロンを有するかまたは有さない遺伝子。

【請求項4】 請求項2のアロエ・リンゴ酸酵素をコードするcDNA。

【請求項5】 請求項3の遺伝子または請求項4のcDNAを植物に導入して、該植物のリンゴ酸酵素活性を増大させる方法。

【請求項6】 植物がイネである請求項5の方法。

【請求項7】 請求項3の遺伝子または請求項4のcDNAを導入してなる形質転換植物。

【請求項8】 植物がイネである請求項7の形質転換植物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、アロエのリンゴ酸酵素遺伝子およびそれを利用した形質転換技術に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】 植物の生育には、至適環境条件があり、極端な高低温、乾燥、高塩などのストレスを受けると生育が阻害される。従って、そのようなストレスに対して耐性を有する植物を作出することは、食糧の増産および環境保全上重要である。

【0003】 一般に植物には耐乾燥性に限界があり、砂漠地域のような強光、乾燥条件下では生息することができない。これは、日中の激しい蒸散により植物体内の水分が保持できないことに主な原因がある。イネやコムギなどの主要な農作物を含め、地球上の大部分の植物が属するC<sub>3</sub>植物は、日中の激しい蒸散を抑えるため気孔を閉じることがある（宮地重遠編集、現代植物生理学I、光合成、p89～p97、朝倉書店、1992）。C<sub>3</sub>植物は、太陽光が受ける日中に気孔を開き、二酸化炭素を吸収して光合成を行なうため、このように気孔が閉じることになれば光合成能力の低下を招くことになる。

【0004】 これまでに、このような乾燥地帯でも植物を栽培するために、灌漑による水分補給や土壤改良による水分保持能力の向上などの努力が行われてきた。また、これとともに交雑を主体とした育種による耐乾燥性の強い品種の育成が行われてきた。しかし、これらの方法は莫大な時間と経費、労力がかかる。さらに、過剰な

2

灌漑の副産物として土壌への塩の集積が生じて不毛の地となるなど深刻な問題も生じている。そこで、乾燥地域での植物栽培を可能にするために、これらの従来の方法とは観点の異なる新たな解決方法が望まれていた。

## 【0005】

【発明が解決しようとする課題】 本発明者は、乾燥地域に生息する植物が有する耐乾燥性上優れた性質であるCAM（ベンケイソウ型有機酸代謝）型光合成に着目し、これを利用することによって上記の問題解決を行うこと

10 ができるのではないかと考えた。アロエなどの乾燥地に生息するCAM型植物では、主に夜間に気孔から二酸化炭素を吸収してリンゴ酸を合成することによって炭酸固定し、これを液胞中に蓄積する。蒸散が活発になる昼間には気孔を閉じて大気からの二酸化炭素の吸収は行わないが、夜間に合成して液胞に蓄積したリンゴ酸を脱炭酸することによって得られる二酸化炭素をカルビン回路での炭酸固定反応に利用し、糖の合成を行なう。リンゴ酸酵素はこの脱炭酸の反応を触媒する。そのため、この酵素はCAM型光合成における重要な酵素である。リンゴ酸酵素の存在はCAM植物のみならずC<sub>3</sub>植物やC<sub>4</sub>植物でも知られている。

【0006】 リンゴ酸酵素の生化学的な研究は多数知られている（M. クールゲ、I. P. ティン共著、野瀬昭博訳、砂漠植物の生理・生態、p61～p63、九州大学出版会、1993）。しかし、この遺伝子に関する研究はC<sub>3</sub>植物であるイネ（内宮ら、日本遺伝子データバンク（DDBJ登録番号：D16499）、インゲン（M. H. Waller et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85, 5546-5550, 1988）、ボブラ（V. Doorslaer et al. Plant Physiol. 96, 1385-1386, 1991）、C<sub>4</sub>植物であるトウモロコシ（B. A. Rothermel & T. Nelson, J. Biol. Chem. 264, 19587-19592, 1989）、Flaveria (D. Boersch & P. Westhoff, FEBS Lett. 273, 111-115, 1990) で報告されているが、CAM植物での報告例はほとんどない。唯一、塩ストレスによってC<sub>3</sub>型光合成からCAM型光合成に変化する双子葉植物のアイスプラントからのクローニングの例があるので（J. C. Cushman, Eur. J. Biochem. 208, 259-266, 1992）、ライフサイクルを通じてCAM型光合成を行なう植物からのクローニング40 例はない。

【0007】 従って、本発明の目的は、CAM型光合成の酵素であるリンゴ酸酵素をコードする遺伝子を提供し、これを一般の植物に導入し、リンゴ酸酵素の活性を増大させることでCAM型光合成の機能を付与させ、それによって耐乾燥性の強い植物を育成することである。

## 【0008】

【課題を解決するための手段】 上記本発明の目的は、配列番号1の229から1983番までの塩基配列もしくは配列番号2の308から2083番までの塩基配列を含むアロエ・リンゴ酸酵素のcDNA、配列番号1の1

3

から585番のアミノ酸配列もしくは配列番号2の1から592番のアミノ酸配列またはこれらアミノ酸配列において1もしくは複数のアミノ酸が付加、欠失もしくは置換された配列で表されるアロエ・リンゴ酸酵素活性を有するアロエ・リンゴ酸酵素をコードする遺伝子またはcDNA、およびこれらの遺伝子またはcDNAで植物を形質転換する技術により達成される。

【0009】本発明者はこれまでに報告のあるアイスプラント、C<sub>3</sub>植物であるイネおよびC<sub>4</sub>植物であるトウモロコシのリンゴ酸酵素の塩基配列をもとに単子葉のCAM植物であるアロエのリンゴ酸酵素cDNAの単離を試みた。他の植物で報告されているリンゴ酸酵素とアロエのリンゴ酸酵素との類似性が示唆されたので、これらの既知の遺伝子を遺伝子単離のためのプローブとして遺伝子ライブラリーからの単離を試みた。しかし、この方法ではアロエのリンゴ酸酵素の遺伝子を単離することはできなかった。そこで、既知のリンゴ酸酵素遺伝子の間で保存されている塩基配列をもとにプライマーを合成し、PCR(Primer Chain Reaction)法によりアロエの全RNAからリンゴ酸酵素cDNA断片の増幅をすることを計画した。PCR法は、錆型の変性、錆型DNAへのプライマーのアニール、プライマーからのDNA伸長という各反応を温度制御して数十サイクルも行なうことにより、プライマー間のDNA断片を特異的に多量に増幅する方法である。

【0010】PCRの結果、対応する断片の増幅が得られた。この断片の塩基配列を決定し、これによって規定されるアミノ酸配列を既知のリンゴ酸酵素のものと比較したところ相同性がみられた。そこでアロエのリンゴ酸酵素に対応する断片であることがわかった。そこで、これをプローブとしてアロエのcDNAライブラリーからアロエのリンゴ酸酵素のcDNAの単離を試みた。その結果、目的とするアロエリンゴ酸酵素の全長の2種類のcDNAをクローニングすることに成功した。これまでに、植物のリンゴ酸酵素遺伝子が1つの植物で数種存在することは、アイスプラント(J. C. Cushman, Eur. J. Biochem. 208, 259-266, 1992)、Flaveria(M. S. Rajeevan et al. Plant Mol. Biol. 17, 371-383, 1991)、ウチワサボテン(Biochem. Biophys. Acta 167, 239-249, 1968)およびトウモロコシ(P. Pupillo & P. B. Rossi, Planta 144, 283-289, 1979)のゲノミックサンハイブリザイゼーションの解析から示唆されていたが、実際に数種を単離してその存在を明確にしたのはこれが最初である。アロエで単離された2種類は、双方とも緑葉よりcDNAとして得られたため、ともにCAM型光合成で重要な働きをするアイソザイムをコードすると考えられた。さらに、当該cDNAを用いて、植物で有効に発現するプライマーを利用した発現プラスミドを構築し、イネに導入し、形質転換植物を得た。

【0011】本発明におけるアロエ・リンゴ酸酵素は代

4

表的には配列番号1の1~585番のアミノ酸配列または配列番号2の1~592番のアミノ酸配列で表される。ただし、一般的にタンパク質のアミノ酸配列においては、その一部が付加、欠失もしくは置換されていてもタンパク質の機能、活性が実質的に変化しないことがあることが広く知られている。特に、タンパク質の活性を中心以外の領域においてはそうである。従って、配列番号1または2と一部異なっていても、アロエ・リンゴ酸活性を有するものは本発明の範囲内である。また、本発明の遺伝子またはcDNAにおいても、配列番号1または2のアミノ酸配列のアロエ・リンゴ酸酵素をコードするもののみならず、上記の一部が異なったアミノ酸配列をコードするものも含まれることは当然である。

【0012】本発明において形質転換の対象となる植物に特に制限ではなく、例えばソルガムや双子葉植物のタバコ、ジャガイモ、ダイズ、アブラナ、ワタ、ダイコンが挙げられるが、特に形質転換植物が比較的容易に得られるイネ、タバコにおいて実用性が高い。形質転換の方法は常法により行なうことができる。例えば、このアロエリンゴ酸酵素遺伝子あるいはcDNAをカリフラワーモザイクウイルス由来のプロモーターや光合成関係のプロモーターなど適当なプロモーターを用いて人工的な発現プラスミドを構築し、これをエレクトロポーレーション、アグロバクテリアあるいはパーティクルガンを利用した方法などによって植物に導入して形質転換体を得ることができる。植物がイネの場合は上記何れの方法によっても、タバコの場合は好ましくはアグロバクテリアあるいはパーティクルガンを利用した方法、トウモロコシ、コムギ、オオムギの場合は好ましくはパーティクルガンを利用した方法を用いるのがよい。

【0013】

【実施例】以下に本発明を実施例に基づき詳細に説明する。操作の手順は特に記述しない限り、Molecular Cloning第2版(J. Sambrookら, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)に記載されている方法に従った。

【0014】実施例1

(1) アロエ緑葉由來のcDNAライブラリーの構築  
アロエ緑葉由來のcDNAライブラリーを調製するためには、アロエの全RNAの抽出を行なった。実験手順は、実験医学、Vo19、No15、p99~p102、1991に記されたAGPC(Acid Guanidium thiocyanate Phenol Chloroform)法に従い、アロエの緑葉5gより全RNAを抽出した。次に、得られた全RNAからcDNAを合成するために、オリゴテックスdT-30(第一化学薬品製)を用い、全RNAからmRNAを含むポリ(A)+RNAの精製を行なった。その調製法は、オリゴテックスdT-30の取扱い説明書に従った。mRNAとして約5μg得られ、そのうちのうち約2μgからストラタジーン社製のZAP-cDNA Synthesis Kitを用いてcDNA合成を行なった。得られたcDNAは、ラバベク

50

ター(UNI-ZAP XR Vector Arms(ストラタジーン社製))のEcoRI認識部位とXbaI認識部位の間に挿入した後、ストラタジーン社製のGIGAPACKII Goldを用いてラムダファージのパッケージングを行ない、これを大腸菌XL1-Blue MRF'に感染させて多数の組換えファージを得た。これをアロエ緑葉のcDNAライブラリーとした。【0015】このcDNAライブラリーの大きさは、ZAP-cDNA Synthesis Kitの取扱い説明書に述べられている方法に従って、組換えファージを希釈して大腸菌に感染させ、寒天培地上でブラークを形成させることによって測定した。その結果、作られたアロエ緑葉由来のcDNAライブラリーは、独立したクローンを $1 \times 10^6$ 個含むことがわかった。この大きさは、遺伝子単離のためのライブラリーとしては充分な大きさであると考えられた。

#### 【0016】(2)アロエのリンゴ酸酵素cDNA断片のクローニング

アロエのリンゴ酸酵素cDNAを増幅することを試みた。PCRのプライマーは、情報検索の結果得られたアイスプラント、イネ、トウモロコシのリンゴ酸酵素遺伝子の塩基配列およびアミノ酸配列を比較して最も相同意の高い領域を選び、これに対応するプライマー、5'-TTTGTTCCTCGGTGCTGG-3'および5'-CCAGGGAAATGTAAGCATT-3'を合成した。これらのプライマーを用いて、アロエ緑葉から抽出した全RNAを錆型として逆転写反応を行ない、対応する一本鎖DNAを合成した。さらに耐熱性DNAポリメラーゼを用いてPCRを行なった。これにより、リンゴ酸酵素遺伝子に相当すると考えられる特異的なDNA断片が増幅されたため、これを単離し、TACloning Kit(インビトロゲン社製)を用いて、これに付属するベクターpCR IIにクローニングした。クローニングされたDNA断片の塩基配列の決定は、自動DNAシーケンサーを用いて、サンガー(ダイオキシン)法に準じたダイプライマー法およびダイターミネーター法で決定した。これにより得られた塩基配列を配列番号3に示す。この塩基配列によって規定されるアミノ酸配列は、すでに報告されているアイスプラントおよびイネのNADP型リンゴ酸酵素とそれぞれ80.1%、82.8%の相同意を示したことから、該塩基配列がリンゴ酸酵素由来すると考えられた。そこでこれを用いて、アロエのリンゴ酸酵素cDNAの単離を行なうことになった。

【0017】(3)アロエリンゴ酸酵素cDNAの単離  
(1)項で調製したアロエのcDNAライブラリーの中からアロエのリンゴ酸酵素cDNAを単離するために、以下の実験を行なった。まず、(1)項で得られたアロエ緑葉cDNAライブラリーに含まれるファージ由來のブラークを寒天培地上に形成させ、それをナイロン膜(アマシャム社製ハイボンドN)に転写した。ナイロン

膜に転写されたファージのブラークに含まれているファージDNAは、アルカリ変性液(1.5M NaCl, 2.0M NaOH)および中和液(1.0M Tris-HCl pH5.0, 2.0M NaCl)でそれぞれ10分間処理した後、UV照射を行なってナイロン膜上に固定した。次に、(2)項で得られたPCR增幅断片を非放射性のDIGでラベルしてプローブとし、先述したファージDNAを固定したナイロン膜とブラークハイブリダイゼーションを行なった。なお、プローブのラベリングはベーリンガー・マンハイム社製のDIG-ELISA DNA Labeling & Detection Kitを用い、ハイブリダイゼーションの実験は、その取扱い説明書に書かれている方法に従って行なった。ブラークハイブリダイゼーションの結果、14個のブラークがプローブに対し強いシグナルを示したため、これらのブラークに含まれる組換えファージがリンゴ酸酵素cDNAを含む可能性が強く示唆された。そこでこれらのファージを集め、ラムダファージよりcDNAを含むDNA断片を抽出し、プラスミドベクターであるpBluescriptに移した。この操作によって得られた14個のプラスミドDNAをそれぞれpCC1~pCC14と命名した。

【0018】(4)サンハイブリダイゼーション  
pCC1からpCC14までの14個のプラスミドクローンを制限酵素EcoRIとXbaIで同時に切断した後、アガロースゲル電気泳動によって分離した。次に、凝固ブロティング装置(ファルマシアLK B社製Vacugene Blotting System)によってDNA断片をナイロン膜に転写した後、(3)項に示した方法で変性、中和凍結を行ない、(3)項で用いたプローブを利用してサンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、すべてのクローンが陽性のシグナルを示した。しかし、プローブに対するシグナルに強弱がみられ、プローブに対する相同意の異なる2つのタイプのリンゴ酸酵素が存在する可能性が示唆された。

【0019】(5)制限酵素地図の作成  
(4)項で得られたクローンのうち、ハイブリダイゼーションで強いシグナルを示したクローンと弱いシグナルを示したクローンについて制限酵素地図を作成した。図1にはその代表的なものを示す。これらのクローンの制限酵素地図は互いにく似ていたため、類似なcDNAであると考えられた。そこでこれらのうち、ブラークに対する相同意の異なる2種類のクローンの中で最も長いcDNAクローンであるpCC10とpCC1の塩基配列を調べた。

【0020】(6)cDNAの塩基配列の解析  
塩基配列の決定は、(2)項で述べた方法で行なった。これにより決定されたpCC4とpCC10由来のcDNAの塩基配列をそれぞれ配列番号1および2に示す。配列番号1および2の塩基配列はそれぞれ85および592アミノ酸残基からなるタンパクをコードしている。これらの塩基配列から規定されるタンパクのアミノ

7

酸配列を、アイスプランツ、イネ、トウモロコシのNADP型リンゴ酸酵素のアミノ酸配列と比較したところ、76%~84%（配列番号1）、56%~70%（配列番号2）の相同意がみられた。従って、pCC10およびpCC4に含まれるcDNAは、アロエのNADP型リンゴ酸酵素cDNAをコードしていると考えられた。また、これらの2種類のリンゴ酸酵素は互いにアイソザイムであることがわかった。そこでこれらのタンパクをそれぞれAME1、AME2と命名した。

【0021】(7) 発現ベクターの構築とイネの形質転換

AME1（pCC10由来）およびAME2（pCC4由来）をカリフラワーモザイクウイルス由来の35Sプロモーターとクロロフィルa/b結合タンパク（Cab）のプロモーターで発現するようなプラスミドの構築を試みた。cDNAを含む領域は、制限酵素BamHIとKpnIで同時に切断して抽出した。35SのプロモーターとNOS（ノバリン合成酵素）のターミネーターを含むBamHI-KpnIのプラスミド断片の調製は以下のように行った。まず、pBI221（TOYO BOより購入）をBamHIとSacIで切断した後、SacI突出末端に合成リソカーラ'-CCCCGGGT ACCGAGCT-3'を結合してKpnI認識部位を導入し、最後にKpnIで切断した。このようにして得られた35Sのプロモーターを含むプラスミドにpCC10由来のcDNA含む断片を結合した。ここで得られたプラスミドをpMS1と命名した。同様に、pCC4由来のcDNAについてもプラスミドを構築し、pMS2と命名した。CabのプロモーターとNOSのターミネーターを含むBamHI-KpnIのプラスミド断片の調製は、pLHC4.4（Y. Tada et al. EMBO J. 10, 1803-1808, 1991）を用い、pBI221の場合と同様に行なった。得られたCabのプロモーターを含むプラスミド断片にpCC10由来のcDNA含む断片を結合した。こうして得られたプラスミドをpMC1と命名した。同様に、pCC4由来のcDNAについてもプラスミドを構築し、pMC2と命名した。

【0022】以上の構築した遺伝子の物理地図を図2お\*

#### 配列

GGCACGAGAA	GGCGCCAGCT	TTTTGGTAAT	TTCACTCGTT	CAGACTAGTC	TCAATTCTATT	60									
TGTTAAATTG	CAAAAACACC	CTATTAAGAA	TCAAACGCAA	TAATTTCGTC	AAAGGTCCAC	120									
ACCTTCACAT	GTTCAATCAA	TCAAACCGCG	GGTACTCCCA	CTAACTCCCG	CAATTAAAAA	180									
AAGACTCGCG	TAAGAAAAGA	TCGGATTTTT	CGTTTCGGAG	TGAAGACT	ATG ACA AGC	240									
					Met Thr Ser										
			1												
GAT	AGT	GCG	TCG	GTG	CTC	5									
Asp	Ser	Ala	Ser	Val	Ileu	Asp									
						10									
						15									
GGA	GTT	GAG	GAC	GCG	TAC	GGT	GAA	GAT	CGG	ACT	GAG	GAG	CAG	CTC	285
Gly															
Val															
Glu															
Asp															
Ala															
Tyr															
Gly															
Asp															
Gln															
Ala															
Thr															
Glu															
Glu															
Gln															
Leu															

\* より図3に示す。これらのプラスミドを多田らの方法（Tada et al. Theor. Appl. Genet. 80, 475-480, 1990）に従い、イネ（日本晴）のプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入した。得られた細胞は、藤村らの方法（Fujimura et al. Plant Tissue Culture Lett. 2, 74, 1985）に従い、植物体に再生した。これらの細胞よりDNAを抽出し、導入した遺伝子をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、pMS10およびpMC10に由来すると思われるDNAがそれぞれ3株、5株に確認された。

#### 【0023】

【発明の効果】本発明により、CAM植物であるアロエからリンゴ酸酵素をコードする遺伝子が具現頃クローニングされ、その塩基配列が決定された。これら遺伝子を植物細胞用発現ベクターに組み込み、植物を形質転換することにより、植物内での当該酵素の活性を高めることができる。CAM植物のリンゴ酸酵素活性を導入で発現させることで、リンゴ酸からの脱炭酸が促進され、植物にCAM型の光合成能を付与し、カルビン循環を介する炭酸固定能力を高めることができる。それにより、植物の全体の耐乾燥性とそれに伴う生産性を向上させることができた。

#### 【0024】

##### 【配列表】

【0025】配列番号：1

配列の長さ：2322

配列の形：核酸

鎖の数：二本鎖

トポロジー：直鎖状

30 配列の種類：cDNA to mRNA

起源：

生物名：アロエアルボリセンス (Aloe arborescens)

組織の種類：葉緑体

配列の特徴

1-228 E 5'UTR

229-1983 S CDS

1984-2322 E 3'UTR

9				
20	25	30	35	
GTC ACG CCG TGG ACC ATT TCA GTT GCC AGT GGC TAC TCT TTG TTG CGG				381
Val Thr Pro Trp Thr Ile Ser Val Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Arg				
40	45	50		
GAT CCA CAC CAC AAC AAA GGG CTT GCC TTC ACG GAG AAA GAG AGA GAT				429
Asp Pro His His Asn Lys Gly Leu Ala Phe Thr Glu Lys Glu Arg Asp				
55	60	65		
GCC CAC TAC TTG CGA GGC CTT TTG CCA CCT GTT TGC ATC AGT CAA GAC				477
Ala His Tyr Leu Arg Gly Leu Leu Pro Pro Val Cys Ile Ser Gln Glu				
70	75	80		
CTT CAG GAG AAG AAG CTC ATG CGC AGC CTC CGC CAG TAT CAG GTC CCC				525
Leu Gln Glu Lys Leu Met Arg Ser Leu Arg Gln Tyr Gln Val Pro				
85	90	95		
CTC CAG CGT TAC ATG CGC ATG ATG GAT CTT CAG GAA AGA AAT GAA AGA				573
Leu Gln Arg Tyr Met Ala Met Met Asp Leu Gln Glu Arg Asn Glu Arg				
100	105	110	115	
CTT TTC TAC AAG CTT CTG ATC GAT AAT GTT GAG GAG TTG CTT CGG GTT				621
Leu Phe Tyr Lys Leu Leu Ile Asp Asn Val Glu Glu Leu Leu Pro Val				
120	125	130		
GTT TAC ACG CCA ACA GTT CGT GAG GCT TGC CAG AAG TAT GGT TGT ATC				669
Val Tyr Thr Pro Thr Val Gly Glu Ala Cys Gln Lys Tyr Gly Cys Ile				
135	140	145		
TTT AGG CGT CCA CAA GGT CTT TAT ATA AGC TTA AAA GAG AAG GCA AAG				717
Phe Arg Arg Pro Gln Gly Leu Tyr Ile Ser Leu Lys Glu Lys Gly Lys				
150	155	160		
ATT CTT GAG GTG TTG AAG AAC TGG CCT GAG AGA AGC ATT CAA GTT ATA				765
Ile Leu Glu Val Leu Lys Asn Trp Pro Glu Arg Ser Ile Gln Val Ile				
165	170	175		
CTG GTT ACT GAT GGT GAG CGA ATT TTG GGG CTT CGA GAT CTT CGT TCT				813
Val Val Thr Asp Gly Glu Arg Ile Leu Gly Leu Gly Asp Leu Gly Ser				
180	185	190	195	
CAG GGG ATG GGA ATT CCT GTA GGA AAG CTC TCT CTT TAC ACT GCC CTT				861
Gln Gly Met Gly Ile Pro Val Gly Lys Leu Ser Leu Tyr Thr Ala Leu				
200	205	210		
GGA GGA ATT CAT CCA TCT TCC TGC TTA CCC GTT ACA ATT GAT GTG GGA				909
Gly Gly Ile His Pro Ser Ser Cys Leu Pro Val Thr Ile Asp Val Gly				
215	220	225		
ACA AAC AAT GAG CAA TTA TTG AAT GAT GAG TTC TAT ATT CGA TTG ATG				957
Thr Asn Asn Glu Gln Leu Leu Asn Asp Glu Phe Tyr Ile Gly Leu Arg				
230	235	240		
CAA AAG CGT CCT ACT GGC CAG GAA TAT GCT GAA TTA CTA CAT GAG TTC				1005
Gln Lys Arg Ala Thr Gly Gln Glu Tyr Ala Glu Leu Leu His Glu Ile				
245	250	255		
ATG ACT GCC GTC AAA CAG AAC TAT GGA GAG AAA GTC ATT GTT CAA TAT				1053
Met Thr Ala Val Lys Gln Asn Tyr Gly Glu Lys Val Ile Val Gln Tyr				
260	265	270	275	
GAA GAC TTT GCC AAC CAC AAT GCA TTT GAA TTG CTT GCA AAA TAC ATG				1101
Glu Asp Phe Ala Asn His Asn Ala Phe Glu Leu Leu Ala Lys Tyr Ser				
280	285	290		
AAA AGC CAT CTT GTA TTT AAT GAT ATT CAG GGT AAA GCA TCT CTT				1149

11

Lys Ser His Leu Val Phe Asn Asp Asp Ile Gln Gly Lys Ala Ser Val  
 295 300 305  
 GTC CTT GCA GGT CTT GTT GCA GCA CTG AAA GTG GTT GGC AGA ACT TTA 1197  
 Val Leu Ala Gly Leu Val Ala Ala Leu Lys Val Val Gly Arg Thr Leu  
 310 315 320  
 GCA GAA CAC ACT TTC TTG TTT CTT GGT GCT GGA GAG GCT GGT ACC GAA 1245  
 Ala Glu His Thr Phe Leu Phe Leu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Thr Glu  
 325 330 335  
 ATT GCA GAA CTC ATA GCT CTT GAA ATG TCA AGA CAG ACA AAA GCT CCA 1293  
 Ile Ala Glu Leu Ile Ala Leu Glu Met Ser Arg Gln Thr Lys Ala Pro  
 340 345 350 355  
 ATC GAG GAG ACT CGG AAG AAG ATT TGG CTT GTA GAT TCT AAG GGT TTG 1341  
 Ile Glu Glu Thr Arg Lys Ile Trp Leu Val Asp Ser Lys Gly Ile  
 360 365 370  
 ATT GTG AGC TCA CGC AAG GAA TCA TTG CAG CAC TTT AAA AAA CCA TGG 1389  
 Ile Val Ser Ser Arg Lys Glu Ser Leu Gln His Phe Lys Lys Pro Trp  
 375 380 385  
 GCA CAT GAA CAT GAA CCT GTG AAA ACT CTT TTA GAT GCT GTA AAG ACC 1437  
 Ala His Glu His Glu Pro Val Lys Thr Leu Leu Asp Ala Val Lys Thr  
 390 395 400  
 ATC AAG CCA ACC GTG TTG ATA GGA TCA TCT GGG GTG GGG CAA ACT TTC 1485  
 Ile Lys Pro Thr Val Leu Ile Gly Ser Ser Gly Val Gly Gln Thr Ile  
 405 410 415  
 ACA AAG GAG GTT GCT GAG GCC ATG CCC TCT TTC AAT GAG AAA CCA CTT 1533  
 Thr Lys Glu Val Ala Glu Ala Met Pro Ser Phe Asn Glu Lys Pro Val  
 420 425 430 435  
 ATT CTT GCT CTA TCA AAT CCA ACA TCA CAA TCT GAG TGT ACT CCT 1581  
 Ile Leu Ala Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gln Ser Glu Cys Thr Ala Glu  
 440 445 450  
 CAA GCA TAT AGT TGG AGC GAG GGC CGG GCC ATT TTT GCC ACT GGG AGT 1629  
 Gln Ala Tyr Ser Trp Ser Glu Gly Arg Ala Ile Phe Ala Ser Gly Ser  
 455 460 465  
 CCA TTT GAT CCA GTT GAA TAC AAT GGG AAG CTC TTC GTG CCA GGC CAG 1677  
 Pro Phe Asp Pro Val Glu Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Val Pro Gly Ile  
 470 475 480  
 GCA AAC AAT GCA TAC ATT TTC CCT GGA CTC GGT CTT GGT CTG GTG ATC 1725  
 Ala Asn Asn Ala Tyr Ile Phe Pro Gly Leu Gly Leu Val Ile  
 485 490 495  
 TCA CGA GCA ATA CGT GTA CAT GAT GAA ATG CCT CTT GCT GCT TCT GAA 1773  
 Ser Gly Ala Ile Arg Val His Asp Glu Met Pro Leu Ala Ala Ser Glu  
 500 505 510 515  
 GCT CTG GCT CAG CAG GTG ACA GAA GAG AAT TTC GCT AAT CGA CTG ATT 1821  
 Ala Leu Ala Gln Gln Val Thr Glu Glu Asn Phe Ala Asn Gly Ile  
 520 525 530  
 TAT CCA CCC TTC ACC ATA ATC AGA AAG ATC TCC GCC CAC ATT CGA GCT 1869  
 Tyr Pro Pro Phe Thr Ile Arg Lys Ile Ser Ala His Ile Ala Ala  
 535 540 545  
 AAT GTA GCT GCT AAA GCA TAT GAA CTA GGT CTT GCT ACT CAT CTC CCT 1917  
 Asn Val Ala Ala Lys Ala Tyr Glu Leu Gly Leu Ala Thr His Leu Pro  
 550 555 560

13

CGC CCA GCG AAT CTT GTG AAA TAT GCA GAA AGC CGC ATG TAC AGT CCG 1965  
 Arg Pro Ala Asn Leu Val Lys Tyr Ala Glu Ser Arg Met Tyr Ser Pro  
 565 570 575  
 CTA TAT CGC AGT TAC AGA TAAATTACGA GAGAAGGCCA TTGAGACTTT 2013  
 Leu Tyr Arg Ser Tyr Arg  
 580 585  
 GTTGGCGTAA TTTATACCAA TGTCTGTCT ACCTCTGCAG TTTATAACCG TTAGAGTTGT 2073  
 TGTAGTCGTG CCAGTGTAG TTTCTATGCC TGCGTTCTGC TGCGAAGTCT CGGGTTTAC 2133  
 TTTAGCAAG CAGTCTATC TATTTGAGCT TTGCCCCAAG CTGCTTACA ATATATTGCC 2193  
 TGAACCCT ATATTTGTCC TGAGTTTGT TGGATATTCT TACAATAATG CCTGAAAAAC 2253  
 ACCTCTCA GTCGAGCGGG AATGCAAGT AATGTCGTT TGTAACACTAT TAAAAAAA 2313  
 AAAAAAAA 2322

【0026】配列番号: 2

配列の長さ: 2471

\* 生物名: アロエ アルボレセンス (*Aloe arborescens*)

配列の形: 核酸

組織の種類: 緑葉

鎖の数: 二本鎖

配列の特徴

トポロジー: 直鎖状

1-307 E 5'UTR

配列の種類: cDNA to mRNA

308-2083 P CDS

起源:

2084-2471 E 3'UTR

\*

## 配列

GGCACGAGGA ACAOGCGAGC GGAGTAATCA ATATTCAAA GTTGAGAGA GAGAGAGA 60  
 GAGAGAGAGA GAGAGAGAGG AGGGAGGACA ACATCTTCGT TTGTTCTCG ACTCTCTGTC 120  
 ATCTTCACGG TTCAAATTTC AAGCTGCCGC CATGCTCTCC ACCCTCAAG CGCCCGCTT 180  
 TCTGAAAAGC GAGGAAAAGA TCGAAATTCTT CTCCGGCAG CGAAGGAGAT CCTCCCTGGT 240  
 CGTGCGGCTCA AGAGTGATCA ATTGCTGCAG CGCGAGGAAA GAGGGGGCCA ACTTCAGGG 300  
 GGTGAAG ATG GAG ACC ATG ATG AAG AGT CTG AGA GGC GAC GAC GTG TCG 349  
 Met Glu Ser Met Met Lys Ser Leu Arg Gly Asp Asp Val Ser  
 1 5 10 15

GTG CTG GAT CTC GAT CCG AAG ACA GCT GTT GGA GGT GGG GTC GGT GAC 397  
 Val Leu Asp Leu Asp Pro Lys Thr Ala Val Gly Gly Gly Val Gly Asp  
 15 20 25 30  
 GTG TAC GGC GAG GAC CGG GCG ACT GAG GAG CAG CAA GTC ACG CCT TGG 445  
 Val Tyr Gly Glu Asp Arg Ala Thr Glu Glu Glu Val Thr Pro Ile  
 35 40 45  
 ACT GTT TCA GTT GCC AGT GGT TAC TCT TTG TTG AGG GAT CCA CAC TAC 483  
 Thr Val Ser Val Ala Ser Gly Tyr Ser Leu Leu Arg Asp Pro His Lys  
 50 55 60  
 AAC AAA GGG CTT GCC TTT AGC GAG AAA GAG AGG GAT GCC CAT TAC TTG 541  
 Asn Lys Gly Leu Ala Phe Ser Glu Lys Glu Arg Asp Ala His Tyr Leu  
 65 70 75  
 CGA GGC CTT TTA CCA CCC ACA TGC ATC AGT CAA GAG ATC CAA GTC AAA 589  
 Arg Gly Leu Leu Pro Pro Thr Cys Ile Ser Glu Glu Ile Glu Val Lys  
 80 85 90  
 AAG ATG TTG CAC AAT CTT CGC CAG TAT CAG GTG CCC CTC CAG CGG TAC 637  
 Lys Met Leu His Asn Leu Arg Glu Tyr Glu Val Pro Leu Glu Arg  
 95 100 105 110  
 ATG GCA ATG ATG GAT CTT CAG GAG ATG AAT GAG AGA CTT TTC TAC TAC 695  
 Met Ala Met Met Asp Leu Glu Met Asn Glu Arg Leu Phe Tyr Lys  
 115 120 125

15

CTT CTC ATC GAT CAT GTT GAG GAA TTG CTC CCG GTT TAC ACA CCA	733
Leu Leu Ile Asp His Val Glu Glu Leu Leu Pro Val Val Tyr Thr Ile	
130 135 140	
ACA GTC GGT GAG GCT TGC CAG AAG TAC GCC TGC ATC TTT AGG CGT CCA	781
Thr Val Gly Glu Ala Cys Gln Lys Tyr Gly Cys Ile Phe Arg Arg Pro	
145 150 155	
CAG GGT CTT TAT ATC AGC TTA AAA GAA AAG GGA AAG ATT CTT GAG GTG	829
Gln Gly Leu Tyr Ile Ser Leu Lys Glu Lys Gly Lys Ile Leu Glu Val	
160 165 170	
TTG AAG AAC TGG CCT GAG AGG AAC ATT CAA GTT ATT GTT GTC ACT CAT	877
Leu Lys Asn Trp Pro Glu Arg Asn Ile Gln Val Ile Val Val Thr Asp	
175 180 185 190	
GGT GAG CGC ATT TTG GGG CTT GGC GAT CTT GGT TGT CAG GGG ATG GCA	925
Gly Glu Arg Ile Leu Gly Leu Gly Asp Leu Gly Cys Gln Gly Met Tyr	
195 200 205	
ATT CCT GTA GCC AAG TTG TCC CTT TAC ACT GCC CTA GGA CCC ATT CTT	973
Ile Pro Val Gly Lys Leu Ser Leu Tyr Thr Ala Leu Gly Gly Ile Arg	
210 215 220	
CCT TCT GCA TGC TTA CCA GTC ACC ATT GAC CTG GGG ACA AAC AAT CAG	1020
Pro Ser Ala Cys Leu Pro Val Thr Ile Asp Val Gly Thr Asn Asn Glu	
225 230 235	
CAA CTT TTG AAG GAT GAA TTT TAT ATT GGA TTG AGG CAA AAG CGT CCT	1069
Gln Leu Leu Lys Asp Glu Phe Tyr Ile Gly Leu Arg Gln Lys Arg Ala	
240 245 250	
ACT GGC CAG GAA TAT GCT GAG TTA CTG CAT GAA TTT ATG GCT CCT	1107
Thr Gly Gln Glu Tyr Ala Glu Leu Leu His Glu Phe Met Ala Ala Val	
255 260 265 270	
AAA CAG AAC TAT GGG GAG AAA GTT CTT ATT CAG TTT GAA GAC TTT CCC	1165
Lys Gln Asn Tyr Gly Glu Lys Val Leu Ile Gln Phe Glu Asp Phe Ala	
275 280 285	
AAC CAT AAT GCA TTT GAG TTA CTA GCA AAA TAT AGT ACA AGC CAA CTC	1213
Asn His Asn Ala Phe Glu Ile Leu Ala Lys Tyr Ser Thr Ser His Leu	
290 295 300	
GTC TTC AAT GAT GAT ATT CAG GGA ACG GCT TCT GTT GTA CTT GCT CGG	1261
Val Phe Asn Asp Asp Ile Gln Gly Thr Ala Ser Val Val Leu Ala Ile	
305 310 315	
CTT GTT GCT GCA CTG AAG TTG GTT GGT GGA ACA TTA GCG GAG GAC CCT	1309
Leu Val Ala Ala Leu Lys Ile Val Gly Gly Thr Leu Ala Glu His Thr	
320 325 330	
TTC TTG TTT CTG GGT GCT GGC GAG GCT GGT ACC GGT ATT CCA GAG TT	1357
Phe Leu Phe Leu Gly Ala Gly Glu Ala Gly Thr Gly Ile Ala Glu Val	
335 340 345 350	
ATA GCT CTT GAA ATG TCA AAA CAG ACA AAA GCT CCG GTC GAA GTC ACT	1405
Ile Ala Leu Glu Met Ser Lys Gln Thr Lys Ala Pro Val Glu GTC Thr	
355 360 365	
CGT AAG AAG ATT TGG CTT GTA GAT TCC AAG GAG CTC TTG ATC GTG ACC TCA	1453
Arg Lys Lys Ile Trp Leu Val Asp Ser Lys Gly Leu Ile Val Ser Ile	
370 375 380	
CGC AAG GAT ACA CTG CAA CAC TTT AAG AAG CCT TGG GCA CAT GAA CCT	1501
Arg Lys Asp Thr Ile Gln His Phe Lys Lys Pro Trp Ala His Glu His	

17		18	
385	390	395	
GAA CCT GTT GAC ACT CTC TTA GGG GCT GTG AAG ACC ATC AAG CCA AGA		1549	
Glu Pro Val Asp Thr Leu Leu Gly Ala Val Lys Thr Ile Lys Pro Thr			
400	405	410	
GTG CTG ATA GGA TCA TCC CGA GTG GGG AGA ACT TTC ACG AAG GAG CTC		1597	
Val Leu Ile Gly Ser Ser Gly Val Gly Arg Thr Phe Thr Lys Glu Val			
415	420	425	430
ATC GAG GCC ATG TCC TCT TTC ACC GAG AAG CCG GTG ATT CTT CGG CAA		1645	
Ile Glu Ala Met Ser Ser Phe Thr Glu Lys Pro Val Ile Leu Ala Leu			
435	440	445	
TCA AAC CCA ACA TCG CAG TCT GAG TGT ACT GCT GAA GAA GCA TAC ACT		1693	
Ser Asn Pro Thr Ser Gln Ser Glu Cys Thr Ala Glu Glu Ala Tyr Thr			
450	455	460	
TGG ACT AAG GCC CGA GCC ATT TTT GCC AGC GGG AGC CCA TTT GAT CCA		1741	
Trp Ser Lys Gly Arg Ala Ile Phe Ala Ser Gly Ser Pro Phe Asp Phe			
465	470	475	
GTT TTA TAC AAC GGA AAG CTC TTT GTC CCC CGC CAG GCA AAT AAT GCT		1789	
Val Leu Tyr Asn Gly Lys Leu Phe Val Pro Gly Gln Ala Asn Asn Asn			
480	485	490	
TAC ATT TTC CCC CGA CTC GGT CTT GGA CTG GTG ATC TCC CGA GCA AAT		1837	
Tyr Ile Phe Pro Gly Leu Gly Leu Gly Val Ile Ser Gly Ala Ile			
495	500	505	510
CGT GTA CAT GAC GAC ATG CTT CTT GCA GCT TCC GAA GCA TTG CCT GAG		1885	
Arg Val His Asp Asp Met Leu Leu Ala Ala Ser Glu Ala Leu Ala Gln			
515	520	525	
CAG GTG ACG CAA GAG AAT TTC GCC AAT GGA CTC ATC TAT CCA CCT TAT		1933	
Gln Val Thr Gln Glu Asn Phe Ala Asn Gly Leu Ile Tyr Pro Pro Ile			
530	535	540	
AGC ATA ATC AGA AAG ATC TCT GCC CAG ATC GCT GCT AAT GTA GCA GCT		1981	
Ser Ile Ile Arg Lys Ile Ser Ala Gln Ile Ala Ala Asn Val Ala			
545	550	555	
AAA GCT TAT GAG CTA GGT CTT GCC ACT CGT CTC CCT CGA CCA GGG		2029	
Lys Ala Tyr Glu Leu Gly Leu Ala Thr Arg Leu Pro Arg Pro Alanine			
560	565	570	
CTT GTG AAA TAC GCA GAG AGC TGC ATG TAC ACC CCA GCG TAC CGG ATT		2077	
Leu Val Lys Tyr Ala Glu Ser Cys Met Tyr Thr Pro Ala Tyr Arg Ile			
575	580	585	590
TAC AGA TAAATCAATG GAAGGTGGAC GATATTCTCT TAAATGTTGT ACTTTACCG		2123	
Tyr Arg			
592			
TTCTGAGTTG CCTGTGTTAGG CCTTATAGG TGTCCAGTT TCCAAAGTTT CACCT TTAT	2193		
GTTAGCAAGT AGTCTCTGTC TCTGCGCT GTCTTCTCAC AGTATGCCG CGAG CCA	2253		
GCTTCGCTCA GAGGCGTAAC TTGAATTCA CAGGTCAGT GGGATTATAG ACTAA TCG	2313		
TGTTTTAGTT TTATTCGCTG TGTTGCTCT AGTTGCCAT TCGTTTTGAA ATAA TAT	2373		
GTTGCACCTA ATTTCATGT TGTAACTTT AGTCATATGT AACAGTTGTA TT TATG	2433		
TTTAGTTAC CAGTTGTGC AAAAAAAA AAAAAAAA	2471		

【0027】配列番号：3

\*トポロジー：直鎖状

配列の長さ：454

配列の種類：cDNA to mRNA

配列の形：核酸

起源：

鎖の数：二本鎖

\* 50 生物名：701 アボリセス (*Alnus arborescens*)

組織の種類：緑葉

AGAGGCTGGT ACCCGAATTG CAGAACTCAT AGCTCTGAA ATGTCAGAC AGACCTAGC 60  
 TCCAATCGAG GAGACTCGGA AGAAGATTG CCTTGAGAT TCTAAGGGTT TGATGAG 120  
 CTCAAGCAAG GAATCATGCC AGAACITTA AAAACCATGG GCACATGAAC ATGAACTGT 180  
 GAAACTCTT TTAGATGCTG TAAAGACCAT CAAGCCACG GTGTTGATAG GATCTCTGG 240  
 GGTGGGGCAA ACTTTCACAA AGGAGGTGT TGAGGCCATG TCCTCTTCA ATGAGAACCC 300  
 AGTTATTCTT CCTCTATCAA ATCCAACATC ACAATCTGAG TGTACTGCTG AATATATA 360  
 TAGTGGAGC GAGGGCGGG CCATTTTGC CAGTGGAGT CCATTTGATC CAGTATA 420  
 CAATGGGAAG CTCTTCGTGC CAGGCCAGGC AAAC 484

## 【図面の簡単な説明】

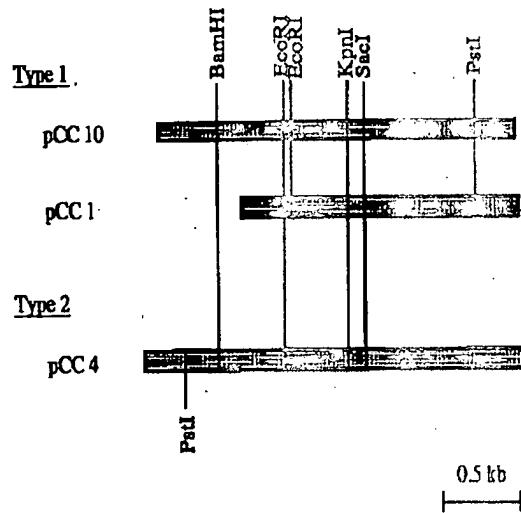
【図1】本発明の実施例で得られたcDNAクローニング。うち、代表的な3クローニングの制限酵素地図を示す図である。

\* 【図2】本発明の実施例で得られたpAMS1とpAM

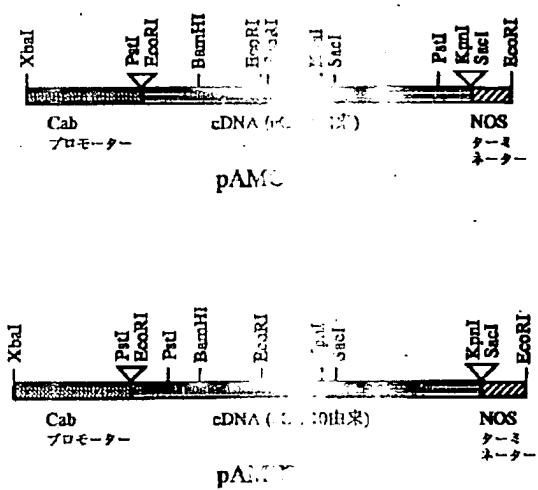
S2の挿入断片の構造を示す図である。

【図3】本発明の実施例で得られたpAMC1とpAMC2の挿入断片の構造を示す図である。

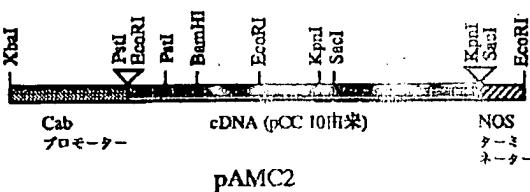
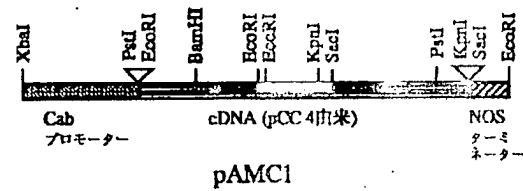
【図1】



【図2】



【図3】



## 【手続補正書】

【提出日】平成6年10月11日

【補正方法】変更

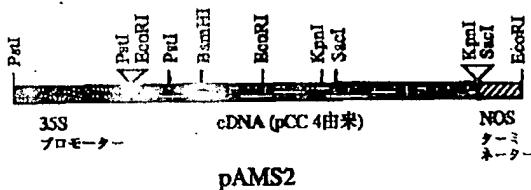
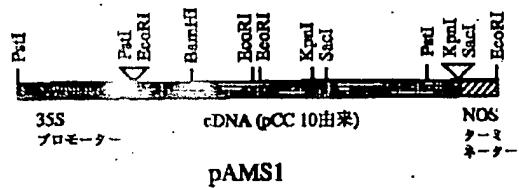
## 【手続補正1】

【補正内容】

【補正対象書類名】図面

【図2】

【補正対象項目名】図2



## 【手続補正2】

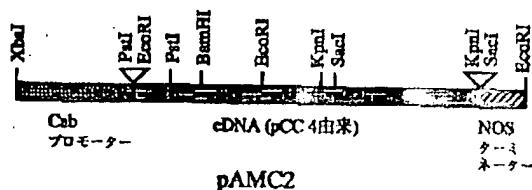
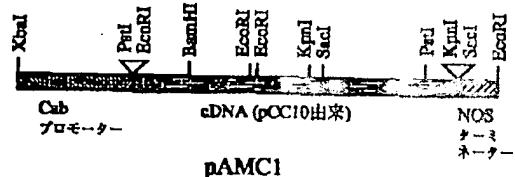
【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図3

【補正方法】変更

【補正内容】

【図3】



This Page Is Inserted by IFW Operations  
and is not a part of the Official Record

## BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

As rescanning documents *will not* correct images,  
please do not report the images to the  
Image Problem Mailbox.